

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 07 December 2000 (07.12.00)	
International application No.: PCT/JP00/03557	Applicant's or agent's file reference: C1-105DP1PCT
International filing date: 01 June 2000 (01.06.00)	Priority date: 01 June 1999 (01.06.99)
Applicant: KITAMURA, Toshio et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
01 June 2000 (01.06.00)

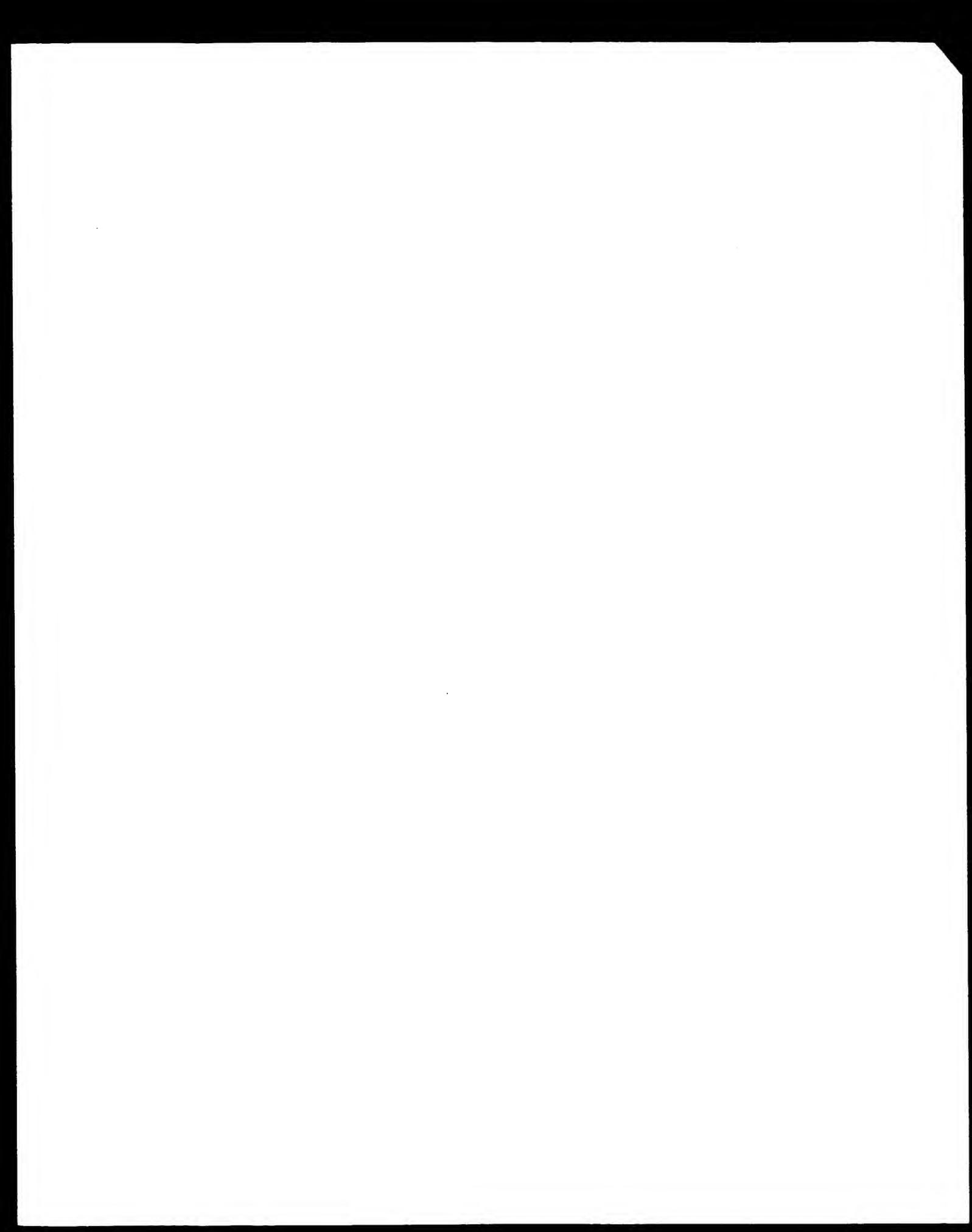
in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



127  
Translation

INTENT COOPERATION TREATY

10/009329

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference C1-105DP1PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/03557	International filing date (day/month/year) 01 June 2000 (01.06.00)	Priority date (day/month/year) 01 June 1999 (01.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/10, 15/48, 15/867, 7/01		
Applicant KITAMURA, Toshio		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 June 2000 (01.06.00)	Date of completion of this report 29 November 2000 (29.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03557

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

 the international application as originally filed the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the claims:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the drawings:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

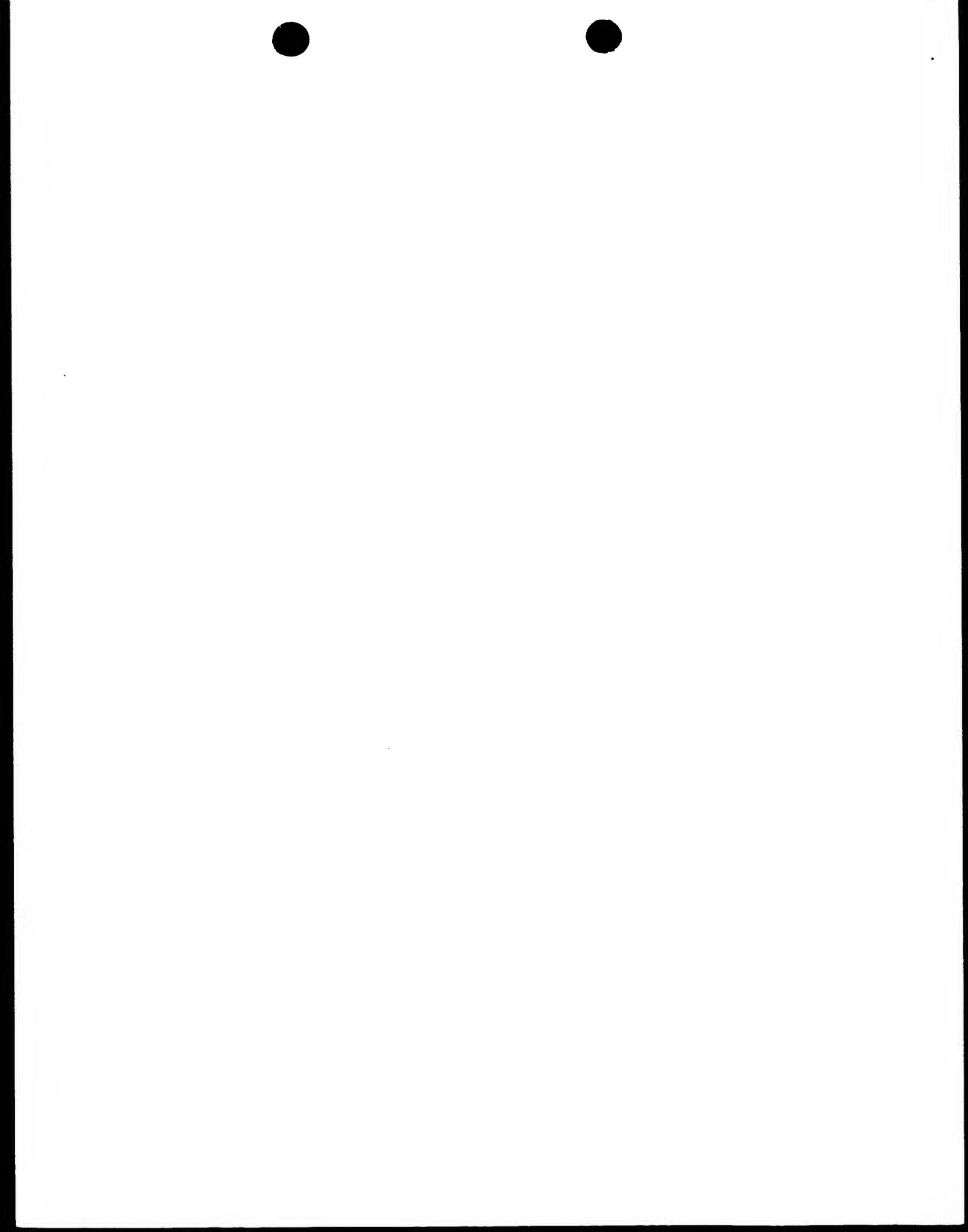
 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4.  The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

Intel. application No.  
PCT/JP00/03557

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	6-7,9-11	YES
	Claims	1-5,8,12-15	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-15	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Document 1: Duisit, G. et al., Hum. Gene Ther., Vol. 10, No. 2, January 1999, p. 189-200

Document 2: Kitamura, T. et al., Jikken Igaku Bessatsu, Shin Idenshi Kougaku Handbook, 1998, p. 245-249

Document 3: Kitamura, T. et al., Int. J. Hematol., Vol. 67, No. 4, 1998, p. 351-359

Based on the description in document 1 cited in the international search report, the inventions set forth in Claims 1-5, 8, and 12-15 do not appear to be novel and do not appear to involve an inventive step. Document 1 describes the preparation of cells having an expression construct in which the DNA that codes for a retrovirus structural protein (env) is functionally ligated downstream of the EF1 $\alpha$  promoter with the objective of producing packaging cells that have the capability of producing virus at a high titer, and the production of retrovirus using these cells.

Based on the descriptions in documents 2 and 3 cited in the international search report, the invention set forth in Claim 15 does not appear to be novel. Documents 2 and 3 describe a process for the production of retrovirus utilizing packaging cells, and the retrovirus produced by the method described in documents 2 and 3 is indistinguishable from the retrovirus set forth in Claim 15.

Based on the descriptions in documents 1-3, the inventions set forth in Claims 6-7 and 9-11 do not appear to involve an inventive step. Document 2 describes the use of an expression vector containing an IRES sequence and the use of 293 T-cells when producing packaging cells. This examination finds that in the process described in document 1, persons skilled in the art can easily utilize an expression vector containing the IRES sequence and utilize 293 T-cells, and persons skilled in the art can utilize a vector containing the Kozak consensus sequence as needed.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03557

## VI. Certain documents cited

## 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO,99/64568,A1	16 December 1999 (16.12.1999)	08 June 1999 (08.06.1999)	08 June 1998 (08.06.1998)

[P,X]

## 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)



VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Kazunori Hashimoto

of 6th Fl., Kantetsu Tsukuba-Science-City Bldg. 1-1-1, Oroshi-machi,  
Tsuchiura, Ibaraki, JAPAN

declare as follows:

1. That I am well acquainted with both the English and Japanese languages, and
2. That the attached document is a true and correct translation made by me to the best of my knowledge and belief of the attached Deposit receipt which is in the Japanese language.

November 26, 2001

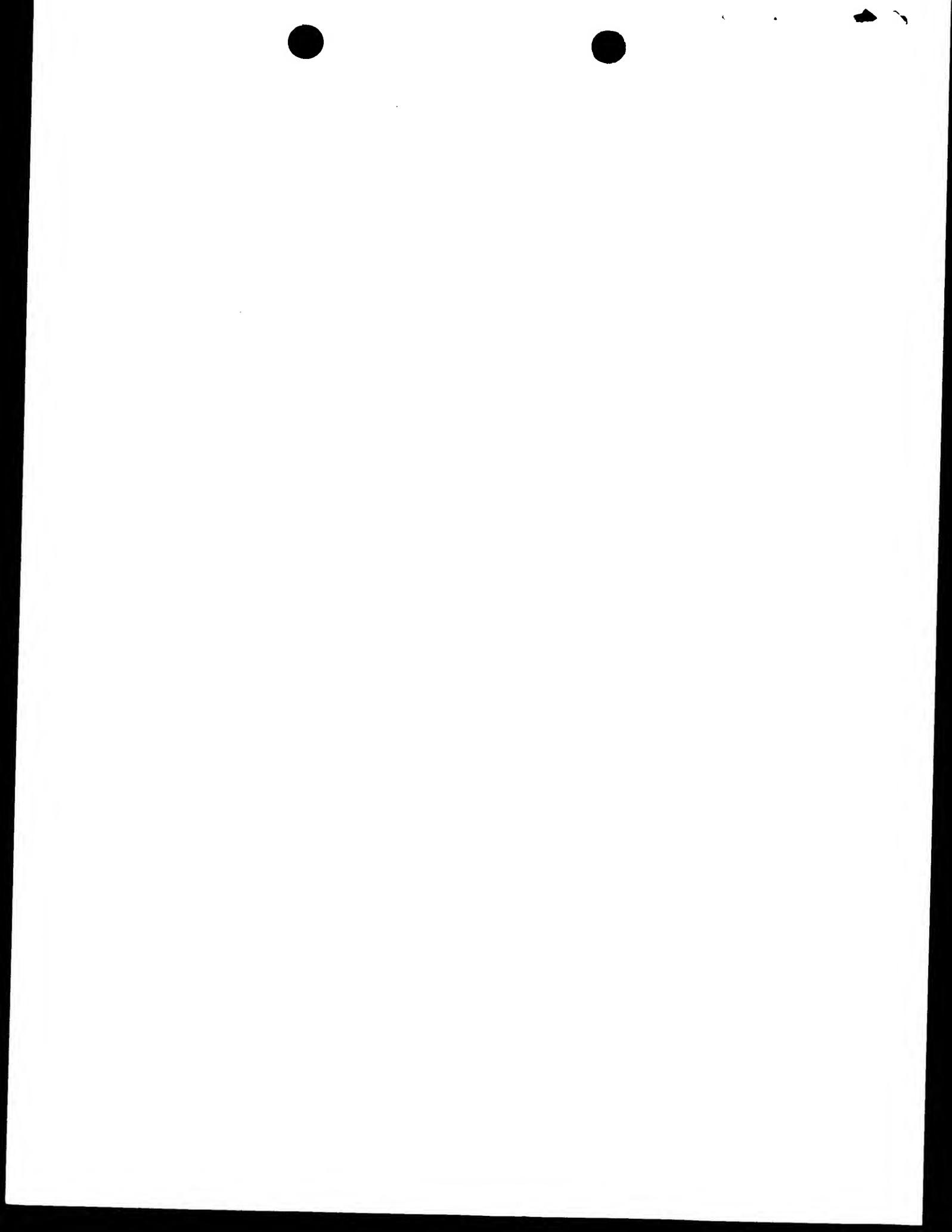
(Date)

Kazunori Hashimoto

(Signature of Translator)

Kazunori Hashimoto

Patent Attorney



〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

氏名（名称） 株式会社中外分子医学研究所  
寄託者 代表者 大杉 義征  
あて名 殿  
〒 茨城県新治郡新治村永井153-2

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

## RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

## 1. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）  
Pt-E

（受託番号）  
FERM BP- 6737

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成11年5月31日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

## 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称： National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Natural Material Science and Technology

所長 大篠 信一

Dr. Shigenori Oshio Director-General

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305-8566, JAPAN

平成11年（1999）5月31日



INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR  
THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

TO: OSUGI Yoshiyuki

Representative

CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

153-2 Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun, Ibaraki

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <b>Pt-E</b>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: <b>FERM BP-6737</b>
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND /OR PROPOSED TAXOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on <b>May 31, 1999.</b>	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY</b>	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology	
<hr/> Dr. Shinichi Ohashi, DIRECTOR GENERAL	
Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, JAPAN	
May 31, 1999-	



[ 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 ]

下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7. 1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名（名称） 株式会社中外分子医学研究所  
代表者 大杉 義征

寄託者 殿  
あて名 〒  
茨城県新治郡新治村永井153-2

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Plat-A

(受託番号)

FERM BP- 6977

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成11年12月22日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

## 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所 長 大 管 信

Dr. Shinichi Itoishi Director-General

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305-8566, JAPAN

平成11年(1999)12月22日



INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR  
THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

TO: OSUGI Yoshiyuki

Representative

CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

153-2 Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun, Ibaraki

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:  
**Plat-A**

Accession number given by the INTERNATIONAL  
DEPOSITORY AUTHORITY:  
**FERM BP-6977**

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND /OR PROPOSED TAXOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

a scientific description  
 a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on  
**December 22, 1999.**

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on and a  
request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on

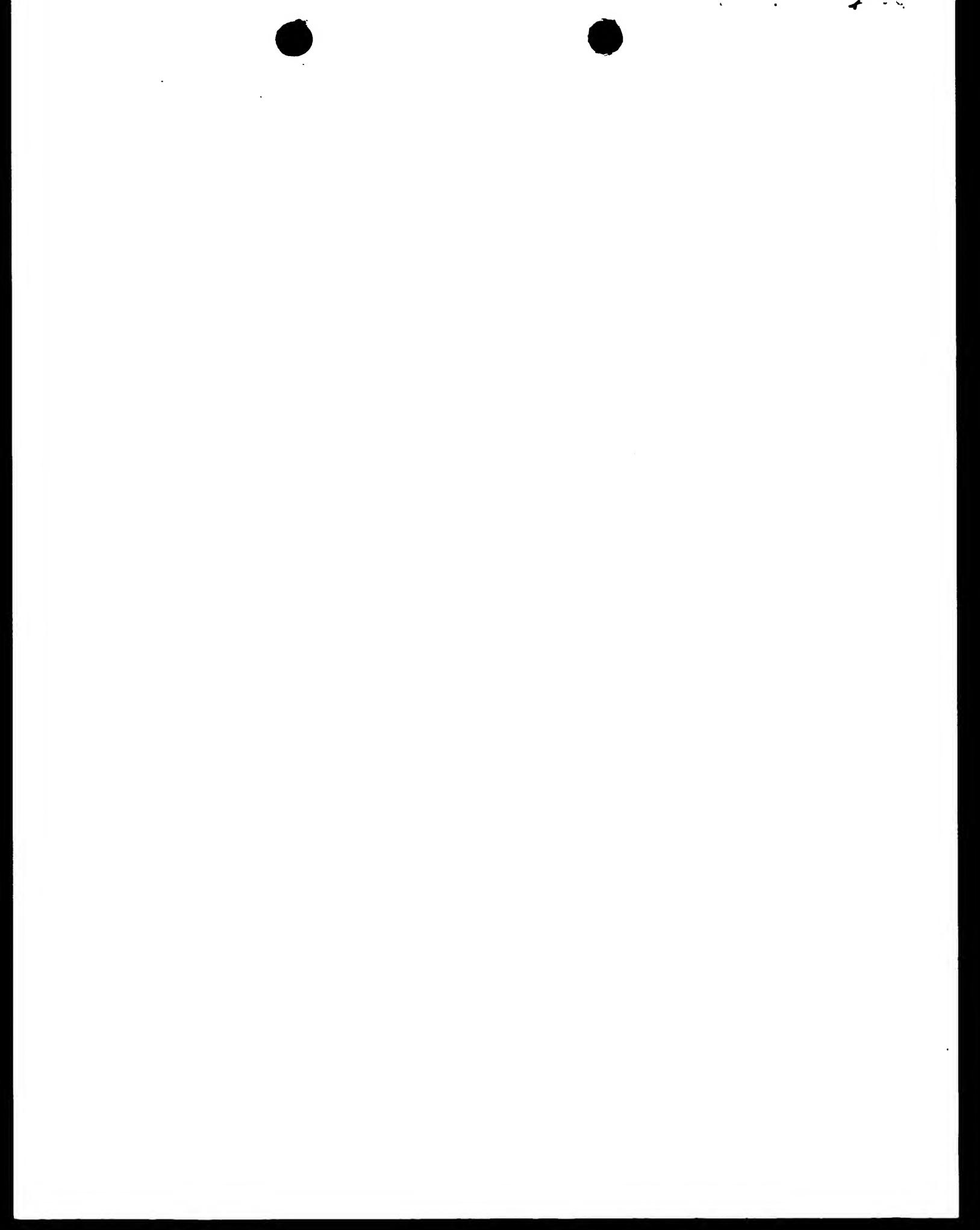
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

\_\_\_\_\_  
Dr. Shinichi Ohashi, DIRECTOR GENERAL

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, JAPAN

December 22, 1999



## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 C1-105DP1PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03557	国際出願日 (日.月.年) 01.06.00	優先日 (日.月.年) 01.06.99
出願人(氏名又は名称) 北村 俊雄		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

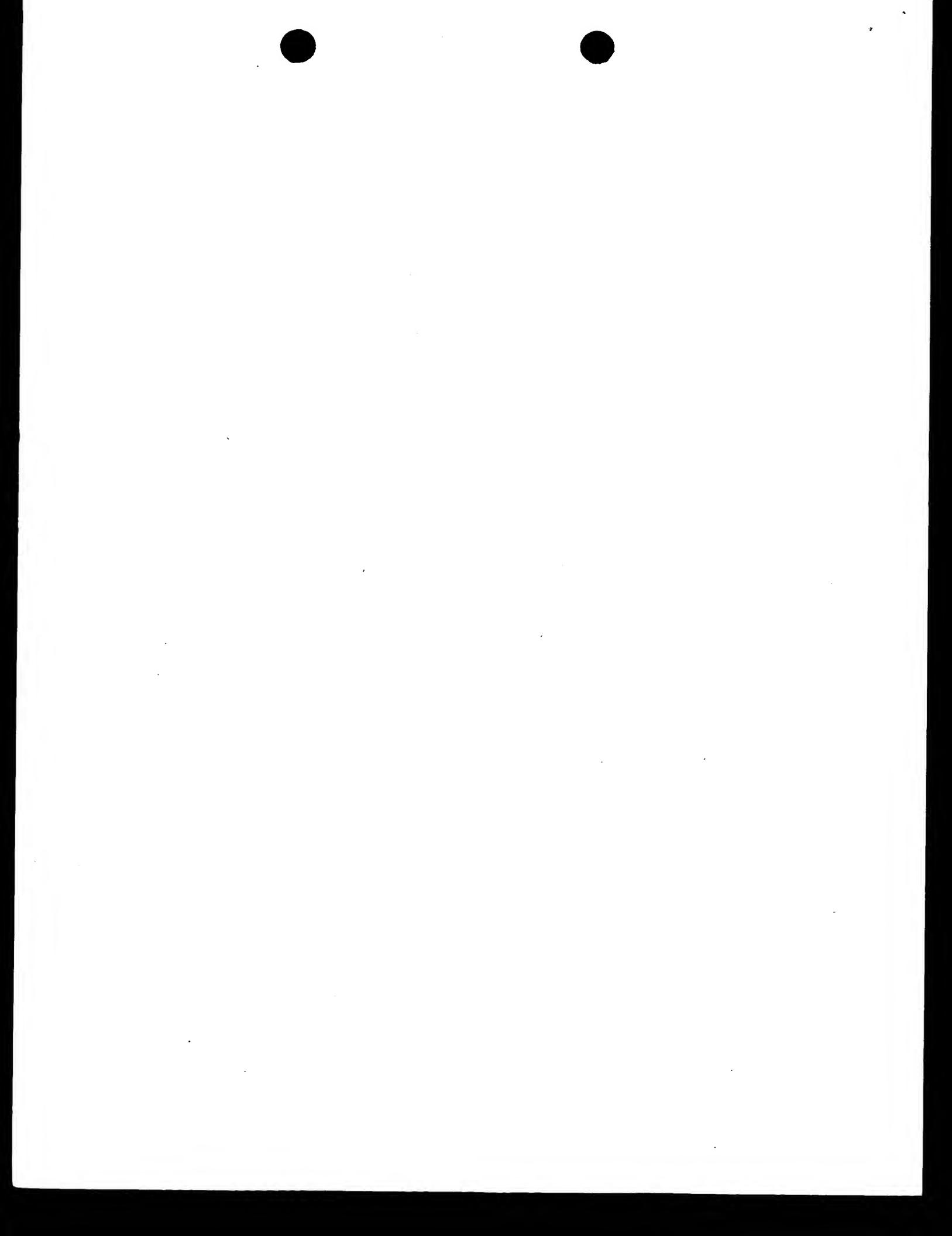
この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎
  - a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
  この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
  - b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
  この国際出願に含まれる書面による配列表
  この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
  出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
  書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
4. 発明の名称は
  出願人が提出したものを承認する。
  次に示すように国際調査機関が作成した。

---

5. 要約は
  出願人が提出したものを承認する。
  第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。
  出願人が示したとおりである。
  なし
  出願人は図を示さなかった。
  本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 5/10, C12N 15/48, C12N 15/867, C12N 7/01

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 5/10, C12N 15/48, C12N 15/867, C12N 7/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	DUISIT, G. et al. "Functional characterization of adenovirus/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer cell lines", Hum. Gene Ther. (1999. Jan.) Vol. 10, No. 2, p. 189-200	1-15
P, X	WO, 99/64568, A1 (UNIV NANTES) 16. 12月. 1999 (16. 12. 99) & FR, 2779445, A1	1-15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

01. 09. 00

## 国際調査報告の発送日

12.09.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

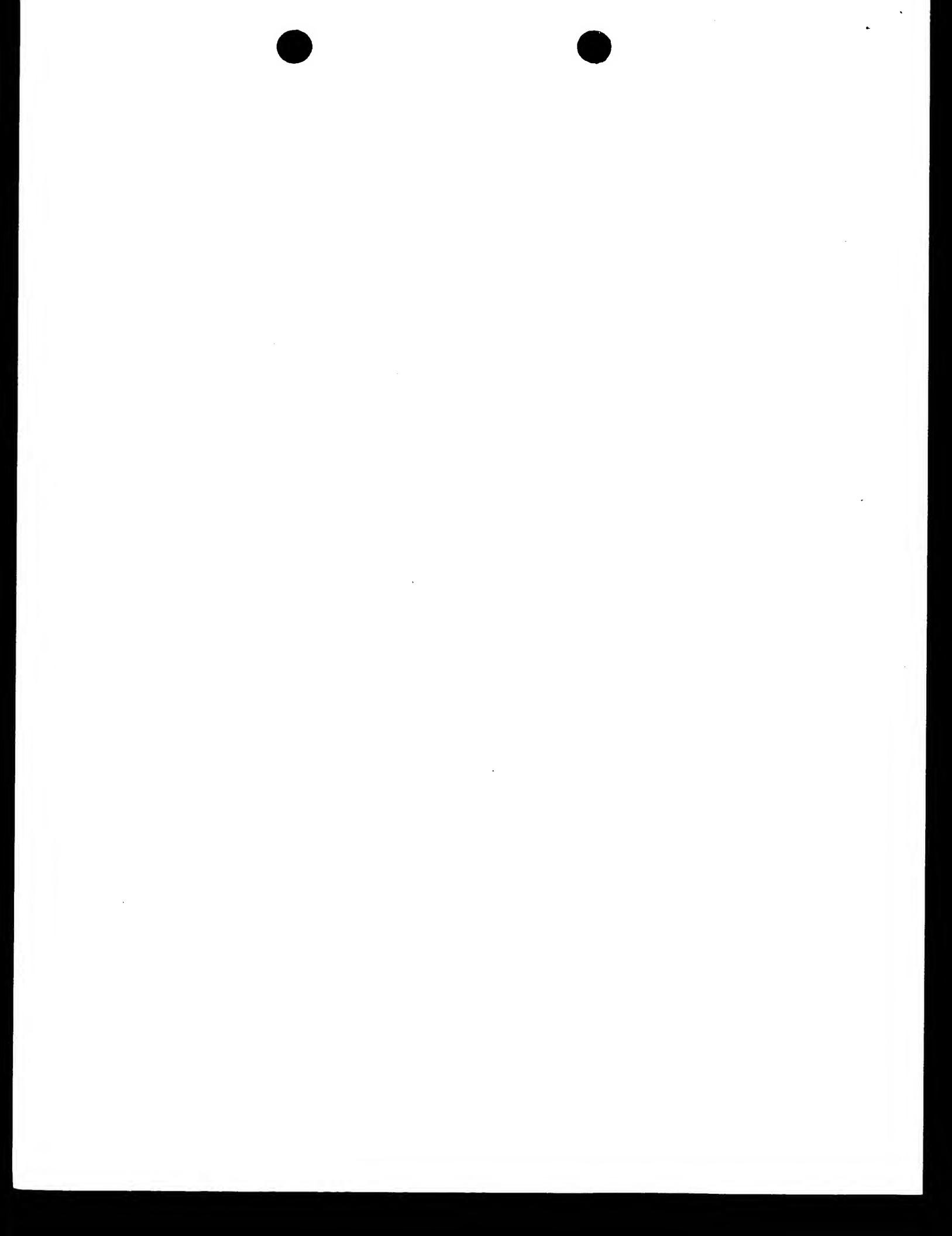
## 特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

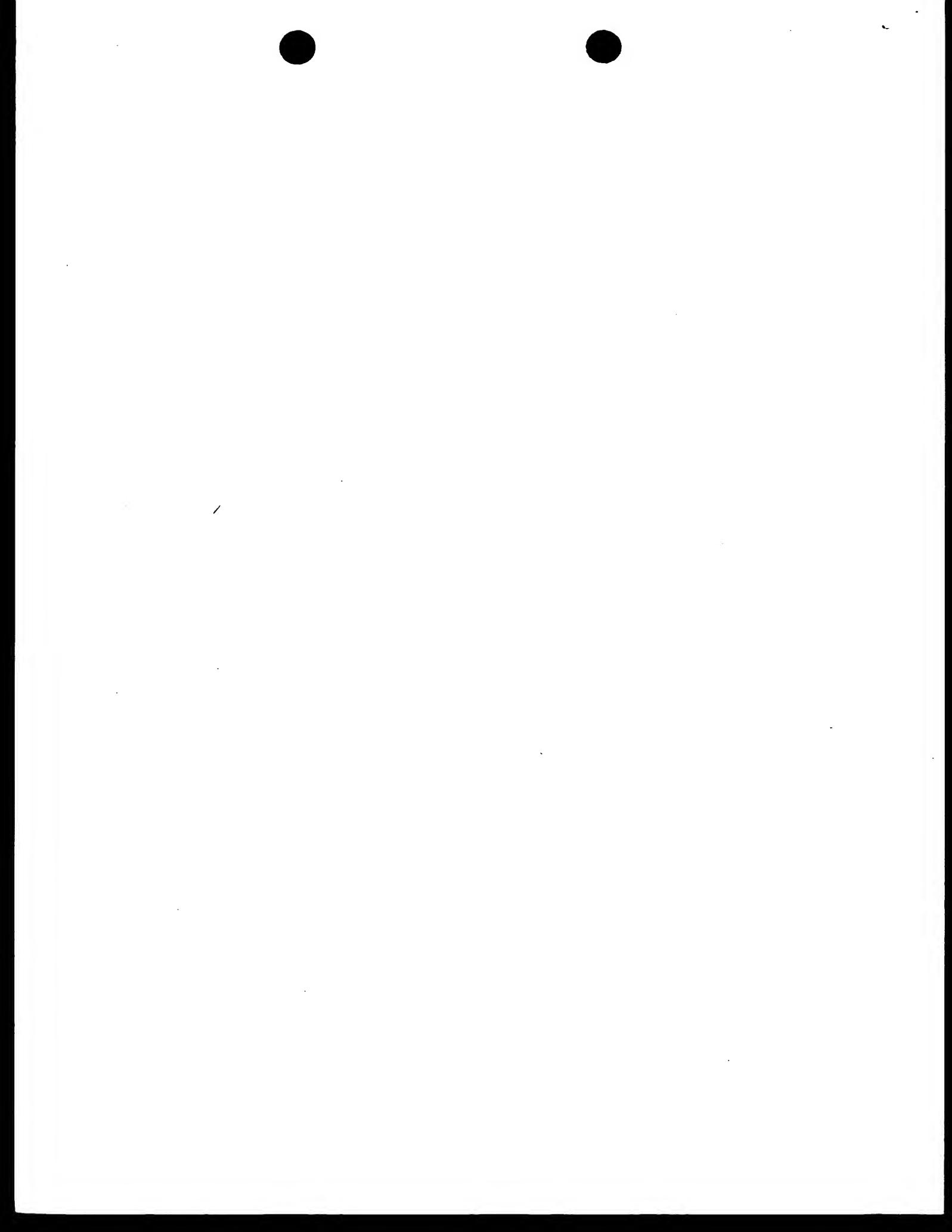
4 B 9281



電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X Y	北村俊雄他「レトロウイルスによる遺伝子導入法とその応用」 実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック (1998) p. 245-249	15 1-15
X Y	KITAMURA, T. et al. "New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening", Int. J. Hematol. (1998) Vol. 67, No. 4, p. 351-359	15 1-15
A	YOGALINGAM, G. et al. "Regulation of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase expression in retrovirus-transduced feline mucopolysaccharidosis type VI muscle cells", DNA Cell Biol. (1999. Mar.) Vol. 18, No. 3, p. 187-195	1-15
T	MORITA, S. et al. "Plat-E:An efficient and stable system for transient packaging of retroviruses", Gene Ther. (2000. Jun.) Vol. 7, No. 12, p. 1063-1066	1-15



10/009329

## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

REC'D 15 DEC 2000

WIPO

PCT

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 C1-105DP1PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03557	国際出願日 (日.月.年) 01.06.00	優先日 (日.月.年) 01.06.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12N 5/10, C12N 15/48, C12N 15/867, C12N 7/01		
出願人（氏名又は名称） 北村 俊雄		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

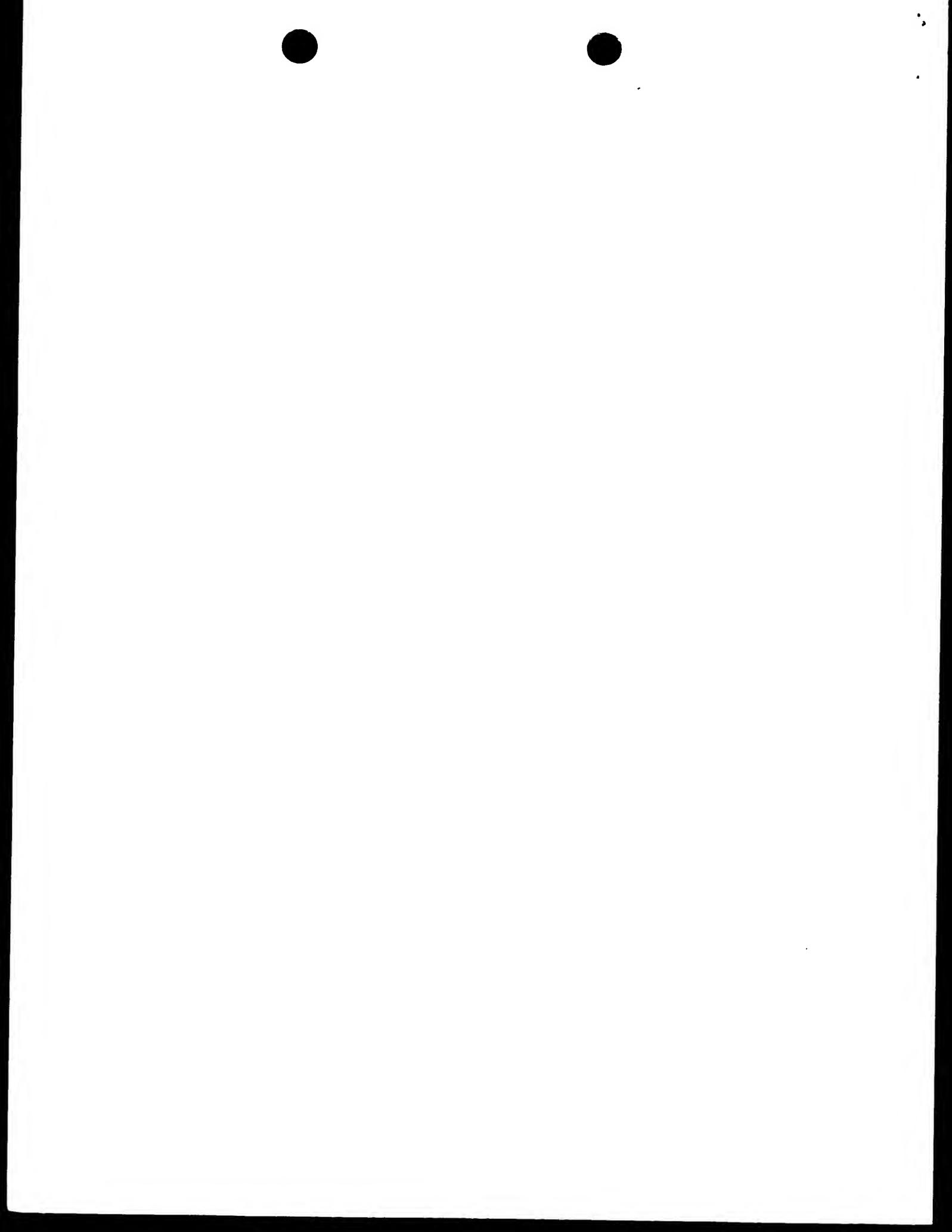
この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I  国際予備審査報告の基礎  
II  優先権  
III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  
IV  発明の単一性の欠如  
V  PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  
VI  ある種の引用文献  
VII  国際出願の不備  
VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 01.06.00	国際予備審査報告を作成した日 29.11.00
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 9281

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	出願時に提出されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
図面	第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

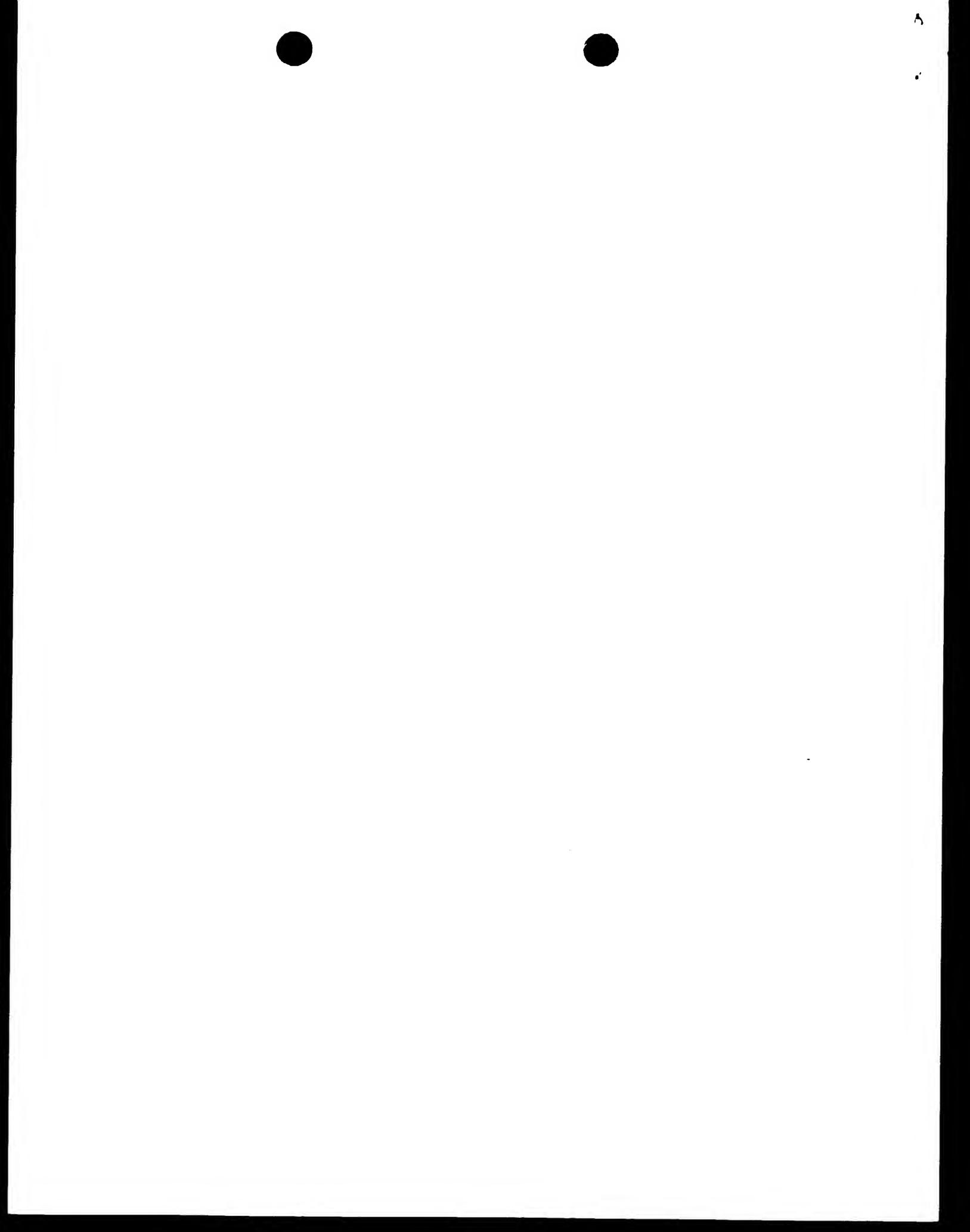
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1. における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 6-7, 9-11 請求の範囲 1-5, 8, 12-15	有 無
進歩性 (I S)	請求の範囲 1-15 請求の範囲	有 無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 1-15 請求の範囲	有 無

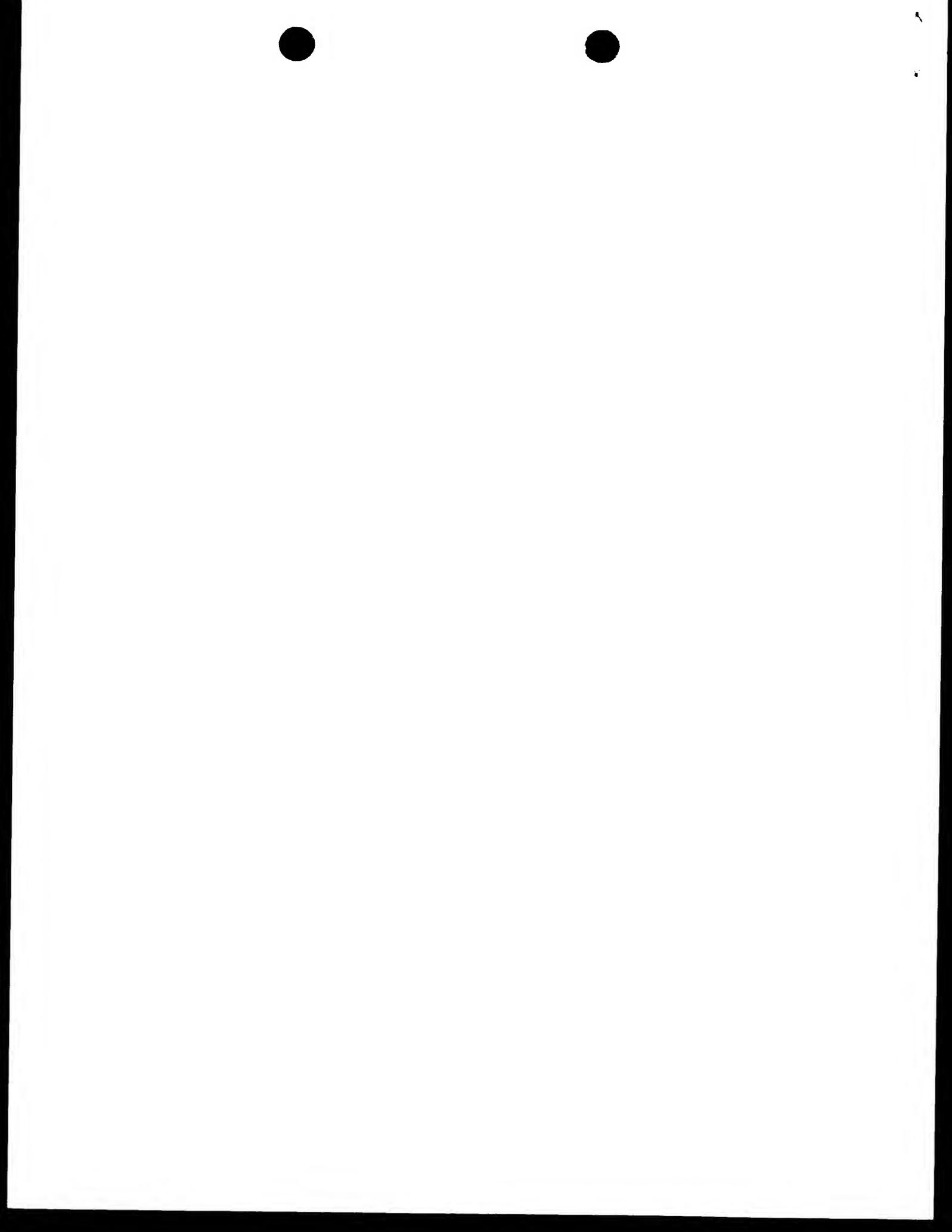
## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : DUISIT, G. et al., Hum. Gene Ther. (1999. Jan.) Vol. 10, No. 2, p. 189-200  
 文献2 : 北村俊雄他, 実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック (1998) p. 245-249  
 文献3 : KITAMURA, T. et al., Int. J. Hematol. (1998) Vol. 67, No. 4, p. 351-359

請求の範囲1-5、8、12-15は、国際調査で引用された文献1により新規性及び進歩性を有しない。文献1には、高力価ウイルスを生産する能力を有するパッケージング細胞を製造することを目的として、EF1 $\alpha$ プロモーターの下流にレトロウイルスの構造タンパク質 (env) をコードするDNAが機能的に結合した発現構築物を有する細胞を作製し、及び該細胞を用いてレトロウイルスを生産することが記載されている。

請求の範囲15は、国際調査で引用された文献2又は文献3により新規性を有しない。文献2、3には、パッケージング細胞を利用したレトロウイルスの生産方法が記載されており、請求の範囲15に記載されたレトロウイルスは、文献2、3に記載されている方法により生産されたレトロウイルスと区別が付かない。

請求の範囲6-7, 9-11は、文献1~3により進歩性を有しない。文献2には、パッケージング細胞を作製する際に、IRES配列を有する発現ベクターを用いること及び293T細胞を用いることが記載されているから、文献1に記載されている方法において、IRES配列を有する発現ベクターを用いること、293T細胞を用いることは、当業者が容易になし得ることであり、また、Kozakのコンセンサス配列を配置したベクターを用いることは、当業者が適宜なし得ることである。



## VI. ある種の引用文献

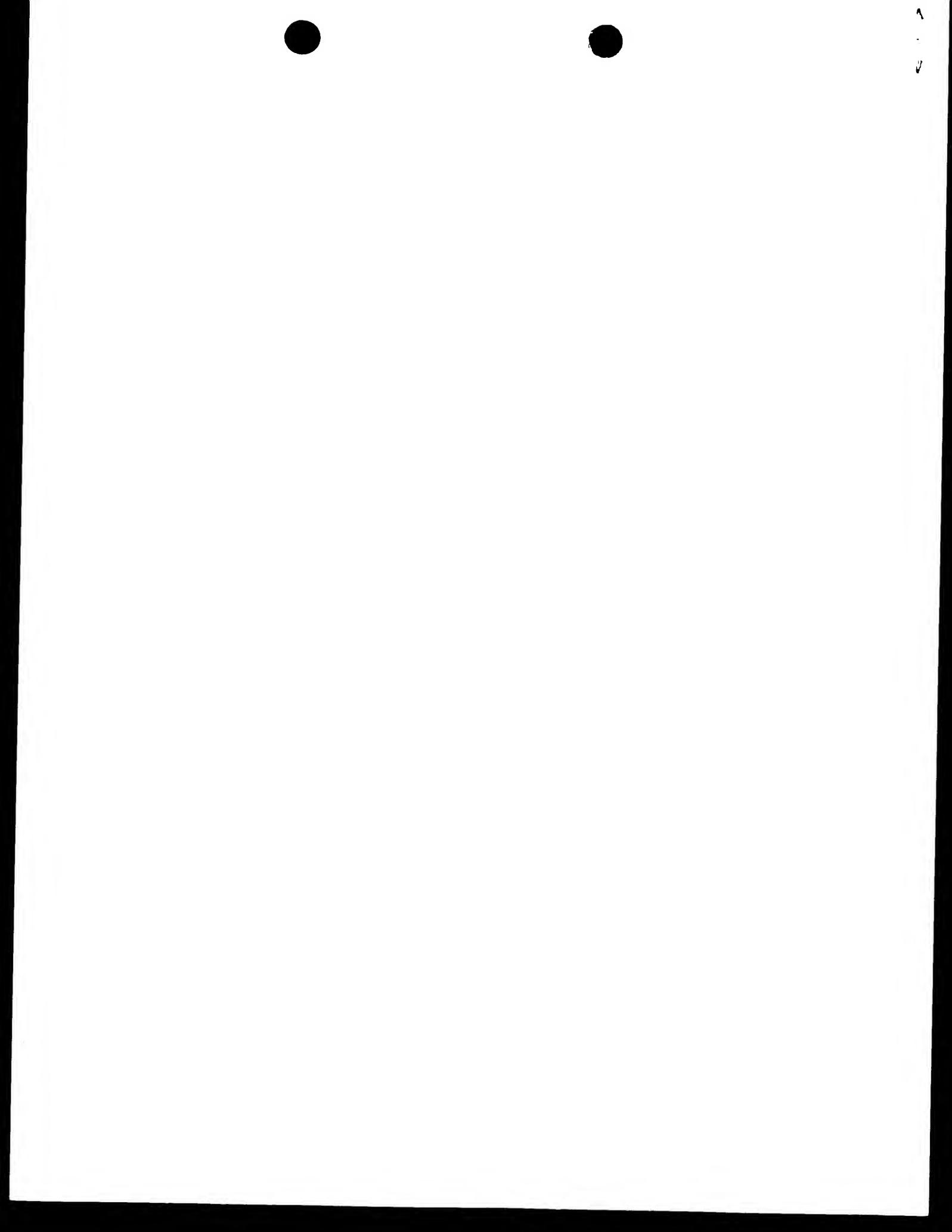
## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
--------------	------------------	------------------	------------------------------

WO, 99/64568, A1 「P, X」	16. 12. 99	08. 06. 99	08. 06. 98
----------------------------	------------	------------	------------

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--



(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2000年12月7日 (07.12.2000)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 00/73423 A1

(51)国際特許分類: C12N 5/10, 15/48, 15/867, 7/01  
 (72)発明者; および  
 (21)国際出願番号: PCT/JP00/03557  
 (75)発明者/出願人(米国についてのみ): 森田純代  
 (22)国際出願日: 2000年6月1日 (01.06.2000)  
 (76) (MORITA, Sumiyo) [JP/JP]; 〒106-0047 東京都港区南  
 (25)国際出願の言語: 日本語  
 (74)代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatushi et al.); 〒  
 (26)国際公開の言語: 日本語  
 300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
 (30)優先権データ:  
 特願平11/154364 1999年6月1日 (01.06.1999) JP  
 特願2000/17831 2000年1月21日 (21.01.2000) JP  
 (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
 (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 中  
 外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI  
 KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目  
 5番1号 Tokyo (JP).  
 (82)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
 (71)出願人および  
 (72)発明者: 北村俊雄 (KITAMURA, Toshio) [JP/JP]; 〒  
 108-0072 東京都港区白金6-16-20-406 Tokyo (JP).  
 (83)指定国(広域): ARPA特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
 MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
 AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
 UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW).

[続葉有]

(54)Title: PACKAGING CELL

(54)発明の名称: パッケージング細胞

(57)Abstract: A virus-producing cell sustaining an ability to produce a virus at a high titer is successfully constructed by expressing a virus structural gene under the regulation by EF1  $\alpha$  promoter. In this virus-producing cell, the virus structural gene is ligated to a selection marker gene via IRES and domains other than the protein coding domain are eliminated from the DNA encoding the virus structural protein. Thus, reduction of the titer due to the cell passage can be prevented and the appearance of a wild type virus caused by unfavorable recombination of the virus genome can be inhibited.

(57)要約:

EF1  $\alpha$ プロモーターの制御下でウイルス構造遺伝子を発現させることにより、高  
力価のウイルスを産生する能力を保持するウイルス産生細胞の作製に成功した。

該ウイルス産生細胞において、ウイルス構造遺伝子と選択マーカー遺伝子を IR  
ESを介して結合させ、またウイルス構造タンパク質をコードするDNAからタンパ  
ク質コード領域以外の領域を除去することにより、細胞の継代による力価の低下  
を防止すると共に、ウイルスゲノムの望ましくない組換えによる野生型ウイルス  
の出現を防止した。

WO 00/73423 A1



LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドンスノート」を参照。

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

- 1 -

## 明細書

### パッケージング細胞

#### 技術分野

本発明は、高力価ウイルスを生産する能力を安定に保持するウイルス生産細胞（パッケージング細胞）およびウイルス生産のための該細胞の利用に関する。

#### 背景技術

レトロウイルスベクターは、宿主細胞に対し高い効率で、しかも安定に遺伝子を導入できることから、細胞への遺伝子導入法として医療分野を含む広い分野で用いられている。レトロウイルスベクターの作製は、レトロウイルスの遺伝子構造、生活環のメカニズムに基づき開発されてきた。その基本原理は、パッケージングシグナルは有するが、gag、pol、env の各構造遺伝子を欠如するレトロウイルスベクターに目的の遺伝子を導入し、当該レトロウイルスベクターを、パッケージングシグナルを欠くが、gag、pol、env の各構造遺伝子を有するパッケージング細胞に導入し、レトロウイルスベクターRNA を含むウイルス粒子を形成（パッケージング）させ、その培養上清にレトロウイルスを産生するものである(Kitamura T., International Journal of Hematology, 67, 351-359, 1998)。この様にして産生されたレトロウイルスは、目的とする遺伝子を効率よく細胞に導入することができる。一方、gag、pol、env の各構造遺伝子を欠如する為、パッケージング細胞の中でのみ複製でき、通常の細胞においては複製できない。従って、作製した感染細胞から再度レトロウイルスが産生されることがない。

このような特徴を有するパッケージング細胞の作製は、国際公開番号 W090/02806、W094/19478、W096/34098 等で示されているが、感染効率、長期安定性の点で満足できるものではなかった。また、ウイルスの力価を高めるために大量のウイ

ルス構造タンパク質をパッケージング細胞中で発現させる必要がある。大量のウイルス構造タンパク質を発現し、継代によっても生産されるウイルスの力価の低下が起こりにくいパッケージング細胞が求められていた。

### 発明の開示

本発明は、高力価の感染性ウイルスを产生する能力を保持するウイルス産生細胞を提供することを課題とする。該細胞の好ましい態様において、長期安定性や安全性が高められたウイルス産生細胞を提供する。また、本発明は、該ウイルス産生細胞を用いる、高力価の感染性ウイルスの生産方法を提供することをも課題としている。

本発明者は、上記課題を解決するために、まず、293T 細胞において、高い活性を有するプロモーターの探索を行った。本発明者は、SV40 プロモーター、SR $\alpha$  プロモーター、EF1 $\alpha$  プロモーター、TK プロモーター、MuLV LTR、CMV LTR の転写活性の強さを調べたところ、EF1 $\alpha$  プロモーターが、他のプロモーターに比較して顕著に高い活性を示すことを見出した。そこで、次に、EF1 $\alpha$  プロモーターを用いた高性能パッケージング細胞の樹立を試みた。

具体的には、本発明者は、パッケージング細胞において、ウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子の発現効率を高めるために、ウイルス構造タンパク質をコードする gag-pol および env 遺伝子を EF1 $\alpha$  の制御下に組み込んだ。さらに、転写された mRNA からのウイルス構造タンパク質の翻訳効率を高めるため、Kozak 配列 (GCCACC) を該遺伝子の翻訳開始コドンの上流に配した。さらに、該遺伝子の下流に IRES 配列 (internal ribosomal entry site: 内部リボソーム侵入部位) を介して選択マーカー耐性遺伝子をつなげることで、1 本の mRNA から IRES 前後にある遺伝子が翻訳され、構築物が導入され発現している細胞を選択マーカーにより確実に選択することを可能にした。すなわち、選択マーカー耐性遺伝子を有する構築物と、gag-pol および env 遺伝子を有する構築物を別々に導入して作製

されていた従来のパッケージング細胞よりも、長期安定性に優れた細胞を作製した。

また、構築物上に、ウイルス構造タンパク質のコード領域のみを PCR によって増幅した遺伝子として gag-pol および env 遺伝子を挿入することにより、パッケージング細胞から組み換えによる野生型ウイルスが產生される可能性をなくし、安全性を向上させた。

本発明者は、このようにして作製されたパッケージング細胞の性能につき検討を行なった結果、該パッケージング細胞は、高力価のレトロウイルスを產生し、4ヶ月の長期継代後でも、それ以前と同等の力価のレトロウイルスを產生する能力を保持していた。本発明のパッケージング細胞は生体内への遺伝子導入のためのベクターの作製に有用であり、特に遺伝子治療などに用いられる高力価レトロウイルスベクターの製造等に好適に利用しうる。

即ち、本発明は、長期間継代しても高力価の感染性ウイルスを產生する能力を保持し、安全性にも優れたウイルス產生細胞、および該ウイルス產生細胞を用いる高力価の感染性ウイルスの產生方法に関し、より具体的には、

- (1) レトロウイルスの產生に用いられる細胞であって、E F 1  $\alpha$  プロモーターの下流にレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが機能的に結合した発現構築物を有する細胞、
- (2) レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、g a g、p o l、e n v からなる群より選択される1または複数のタンパク質をコードするDNAである、(1)に記載の細胞、
- (3) g a g、p o l、e n v のすべてを発現する、(2)に記載の細胞、
- (4) g a g およびp o l を発現する発現構築物とe n v を発現する発現構築物とを有する、(3)に記載の細胞、
- (5) e n v がエコトロピックレトロウイルス由来のe n v またはアンフォトロピックレトロウイルス由来のe n v である、(3)または(4)に記載の細胞、

(6) 発現構築物中のレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAの翻訳開始コドンの上流に、Kozakのコンセンサス配列が配置されている、

(1) から (5) のいずれかに記載の細胞、

(7) レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAがIRES配列を介して選択マーカーをコードするDNAと結合している、(1) から (6) のいずれかに記載の細胞、

(8) レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、該タンパク質のコード領域以外のウイルスゲノム由来DNAを実質的に有さない、(1) から (7) のいずれかに記載の細胞、

(9) 細胞が293細胞由来である、(1) から (8) のいずれかに記載の細胞、

(10) 細胞が293T細胞由来である、(9) に記載の細胞、

(11) 寄託番号FERM BP-6737または寄託番号FERM BP-6977で特定される細胞、

(12) (1) から (11) のいずれかに記載の細胞に、少なくとも1つの構造タンパク質をコードする遺伝子を欠損しているレトロウイルスペクターDNAを導入する工程を含む、レトロウイルスの产生方法、

(13) レトロウイルスペクターDNAが、gag、pol、およびenvをコードする遺伝子をすべて欠損している、(12) に記載の方法、

(14) レトロウイルスペクターDNAに外来遺伝子が含まれている、(12) または (13) に記載の方法、

(15) (12) から (14) のいずれかに記載の方法により生産されたレトロウイルス、を提供するものである。

本発明のパッケージング細胞は、レトロウイルスの構造タンパク質を発現させるために、EF1 $\alpha$ プロモーターを用いることを特徴としている。本発明者等は、パッケージング細胞内で高い活性を示すプロモーターの探索を行なった結果、活性を検出したプロモーターの中で特に EF1 $\alpha$ プロモーターが強力な活性を有すること

とを見出した。本発明のパッケージング細胞は、EF1 $\alpha$ プロモーターを用いることにより、レトロウイルスの構造タンパク質を高発現させ、力価の高いウイルス粒子の生産を行なうことを可能としている。

パッケージング細胞において、EF1 $\alpha$ プロモーターの制御下でレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAを発現させるためには、EF1 $\alpha$ プロモーターの下流にレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが機能的に結合した発現構築物を作製し、これを細胞に導入すればよい。ここで「機能的に結合」とは、EF1 $\alpha$ プロモーターがその活性化によって下流のレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAの発現を保証するように該DNAに結合していることを指す。

細胞において発現されるレトロウイルスの構造タンパク質としては、gag、pol、およびenvが挙げられる。論理的にはパッケージング細胞においてこれらすべてのタンパク質を発現させる必要はなく、レトロウイルスペクターDNAにこのうちのいくつかのタンパク質をコードする遺伝子をのせておくことも可能である。例えば、パッケージング細胞にgag、polを発現させて、env遺伝子はレトロウイルスペクターDNAにのせておくようなことも可能であるが、この場合にはenvの発現量が必要量まで達しない可能性がある。従って、パッケージング細胞においては、gag、pol、envの全てが発現していることが望ましい。

発現構築物としては、gagおよびpolを発現する構築物とenvを発現する構築物を分けて細胞に導入することが好ましい。これにより、レトロウイルスペクターとパッケージング細胞内に存在するpol、gag、envとの間で組換えが生じて、自己複製可能なウイルスが產生される可能性を低下させることができる。このことは、例えば、該細胞により生産されるウイルスを遺伝子治療に用いる際の安全性の点から重要である。gagおよびpolについては同じ構築物にgag-polとしてコードされていることが好ましい。仮に別々の発現構築物とした場合、polのみが多量に発現してしまうと細胞に対して毒性が生じることが知られており、また、polとgagの発現比率が高力価ウイルスの產生に重要であるからである。

env としては、所望によりエコトロピックレトロウイルス由来の env (ecoenv と称する) やアンフォトロピックレトロウイルス由来の env (amphoenv と称する) を用いてパッケージング細胞を作製することができる。ecoenv を有するパッケージング細胞からはエコトロピック (ecotropic) レトロウイルスが産生される。また、amphoenv を有するパッケージング細胞からは、アンフォトロピック (amphotropic) レトロウイルスが産生される。エコトロピックレトロウイルスは、ラットおよびマウスの細胞表面にのみに存在するエコトロピック受容体に結合する糖タンパク質を有することから、ラットあるいはマウス細胞にのみ感染する。一方、アンフォトロピックレトロウイルスは、より広範な種に対して感染可能であり、例えば、ラット、マウス、ヒト、ニワトリ、イヌ、ネコ等に感染できる。例えば、遺伝子治療に用いるレトロウイルスとしては、ヒトに感染可能な amphoenv が用いられる。また、実験室で新規遺伝子のクローニング等に用いる場合には、ヒトに感染できない ecoenv を有するパッケージング細胞から作製されたレトロウイルスを用いることが安全である。

また、ラウス肉腫ウイルス (RSV) 由来の env など種々のレトロウイルス env が使用されうる (Landau N.R. and Littman D.R. (1992) J. Virology 5110-5113)。さらに、レトロウイルス以外のエンベロープタンパク質を使用してもよい。例えば、水疱性口内炎ウイルス (VSV) 由来の G 蛋白質 (VSV-G) を用いることができる (Ory D.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11400-11406)。

本発明のパッケージング細胞においては、好ましい態様として、レトロウイルスの構造タンパク質を発現させるための発現構築物から転写されたこれらタンパク質をコードする mRNA の翻訳効率を高めるため、該発現構築物中のレトロウイルスの構造タンパク質遺伝子の翻訳開始コドン (ATG) の上流に Kozak 配列のコンセンサス配列 (GCCACC) を配することができる (Kozak の法則とは、翻訳開始点 ATG の前の配列に GCCACC が存在する確率が高いことを明らかにしたものである)。

本発明のパッケージング細胞の他の好ましい態様として、ウイルス構造タンパク質および選択マーカーをコードする DNA が IRES を介して機能的に結合し、ウイルス構造タンパク質と選択マーカーとが同時に発現する発現構築物を有するパッケージング細胞が提供される。該発現構築物においては、EF1 $\alpha$ 活性化により転写された單一分子内にウイルス構造タンパク質および選択マーカーがコードされており、該 RNA 分子からは、一方のタンパク質が翻訳されるのみならず、IRES の働きにより選択マーカーも翻訳される。このため該発現構築物が導入されレトロウイルス構造タンパク質を発現している細胞を、該選択マーカーにより確実に選択することが可能となった。従来は、選択マーカー耐性遺伝子を有する発現構築物と、gag-pol および env 遺伝子を有する発現構築物を別々に細胞に導入してパッケージング細胞を作製していたため、選択マーカー耐性遺伝子を有する細胞とウイルス構造蛋白質遺伝子を有する細胞とが必ずしも一致せず、該細胞の安定性に問題が生じていたが、IRES 配列の利用により長期安定性に優れたパッケージング細胞の調製が可能となった。

選択マーカーとしては、実施例に記載したプラスチシジンやピューロマイシンの他に、例えばハイグロマイシン、ジフテリアトキシン、ネオマイシンなどを使うことができる。しかしながら、プラスチシジンやピューロマイシンは、他の薬剤に比べて即効性で細胞の選択に必要な時間が短くてすむという点で好ましい。ジフテリアトキシンおよびハイグロマイシンの耐性遺伝子はそれぞれ「Bishai, W.R. et al., J. Bacteriol. 169: 1554-1563 (1987)」および「ハイグロマイシン: Yin, D.X. et al., Cancer Res. 55: 4922-4928 (1995)」に記載されている。

本発明のパッケージング細胞のさらなる好ましい態様として、EF1 $\alpha$ 制御下のレトロウイルスの構造タンパク質をコードする DNA が、該タンパク質のコード領域以外の DNA を実質的に有さない発現構築物を有する細胞が提供される。本発明のパッケージング細胞においては、構造タンパク質の発現に必須ではないウイルスゲノム由来配列はできる限り除去されていることが好ましい。これにより、上記

発現構築物を有するパッケージング細胞にレトロウイルスベクターDNAを導入した際に、該発現構築物中のウイルスゲノム由来DNAとレトロウイルスDNAの間の組換えの可能性を低下させ、複製能を有するレトロウイルス(RCR)が出現するリスクを最小限に抑制することができる。従って、これによりパッケージング細胞から產生されるウイルス粒子の安全性を向上させることができる。

このようなレトロウイルスの構造タンパク質のコード領域以外のDNAを実質的に有さないDNAは、例えば、実施例に記載されたようにウイルスゲノムDNAを錫型に、ウイルス構造タンパク質のコード領域に対応するプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により得ることができる。ここでコード領域以外のDNAを「実質的に有さない」とは、ウイルスゲノム由来のタンパク質コード領域以外のDNAが、30塩基以下、好ましくは10塩基以下、さらに好ましくは5塩基以下、最も好ましくは0塩基であることをいう。

パッケージング細胞を作成するための宿主細胞としては、トランスフェクションによる遺伝子導入効率が高い細胞であれば制限はなく、例えば、NIH3T3(マウス織維芽細胞)や293(ヒト胎児腎細胞)(Graham, F.L., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977))などを用いることができる。

発現構築物の細胞への導入方法としては、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、あるいはリポフェクタミン(lipofectamine, GIBCO BRL)、フュージン(Fugene, Boehringer Mannheim)等による一般的な遺伝子導入方法を用いることができる。選択方法としては薬剤選択を用いることができ、薬剤選択に用いる薬剤としては薬剤耐性遺伝子が明らかになっているものであれば制限はなく、例えば、プラスチシジン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ジフテリアトキシン、ネオマイシンなどを用いることができる。

得られたパッケージング細胞は、限界希釈し、各クローンにレトロウイルスベクターDNAを導入し、產生されるウイルスの力値を測定して、最も高い力値のウイルスを產生する細胞を選択しクローン化することが好ましい。

パッケージング細胞に導入されるレトロウイルスベクターDNA としては特に制限はない。パッケージング細胞が 293T 細胞のように SV40 ラージ T 抗原を発現する細胞に由来する場合は、SV40 の複製開始点と結合された該ベクターDNA を用いれば、パッケージング細胞内でのコピー数を増加させることができ、力価の上昇を期待することができる。

レトロウイルスベクターDNA の細胞への導入は、上記ウイルス構造タンパク質発現構築物の細胞への導入と同様にして行うことができる。レトロウイルスベクターを導入後、パッケージング細胞の培養上清中に放出されるレトロウイルス粒子を回収することにより、目的のレトロウイルスベクターを調製することができる。

本発明のパッケージング細胞により生産されたレトロウイルスベクターは、広範囲の研究・医療分野に有用に用いられる。例えば、遺伝子治療やモデル動物の作製において目的の遺伝子を *ex vivo* または *in vivo* で発現させるためのベクターとして用いられる。また、抗原タンパク質や免疫機能を高めるタンパク質を発現させるためのワクチンとしても有用である。また、遺伝子機能を解析するための *in vitro* 遺伝子導入ベクターとしても有用である。また、該ベクターを、目的のタンパク質を製造するために用いることもできる。また、cDNA 発現ライブラリーのように、不特定の cDNA 分子種を発現するライブラリーの作製用ベクターとしても有用である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### [実施例 1] FACS-GAL 解析

293 細胞、293T 細胞においてプロモーター活性を比較し、最も高い活性を示すプロモーターを用いるため、FACS-GAL 解析 (Steven N.F., et al., Cytometry, 12,

- 10 -

291-301, 1991)を行った。これはそれぞれのプロモーターの下流に lacZ 遺伝子をつなぎ、細胞内にトランスフェクションしてその細胞内での lacZ の発現分布を調べるものである。

トランスフェクションする 16~24 時間前に 293 細胞、293T 細胞を 6cm 細胞/培養皿に  $2 \times 10^6$  まいた。それぞれのプロモーターの下流に lacZ をつないだプラスミド  $3 \mu\text{g}$ 、Fugene(Boehringer Mannheim 社)  $9 \mu\text{l}$  を  $200 \mu\text{l}$  の胎児ウシ血清を含まない DMEM 培地に混合し、5~10 分おいた。その後、293 細胞、293T 細胞を播いた 6cm 皿にゆっくり加えた。24 時間後細胞をはがし、 $50 \mu\text{l}$  の PBS に懸濁した後、37°Cで 5 分間置いた。FDG(フルオレセイン ジ-β-D-ガラクトビラノシド、モレキユラープローブ、Eugene, OR, カタログ番号 F1179: 2mM in 98% 蒸留水)をあらかじめ 37°Cで温めておき、 $50 \mu\text{l}$  を加えた。37°Cで 1 分間インキュベートしたあと、PBS を 1ml 加え、氷上で 2 時間おく。2 時間後反応を止めるため PETG(フェニルエチル-β-D-チオガラクトシド、Sigma, カタログ番号 P4902)を  $20 \mu\text{l}$  加え、FACS にて細胞内の lacZ の発現分布を調べた。その結果、293T 細胞内において、EF1 $\alpha$  のプロモーター活性が一番高かった。レトロウイルスのプロモーターである LTR と比較した場合、EF1 $\alpha$  のプロモーター活性は約 100 倍高く、その他のプロモーターに対しても数十倍高い活性を示した。

#### [実施例 2] 選択マーカー遺伝子の増幅

選択マーカーとしてプラスチシジン (blasticidin)、ピューロマイシン (puro mycin) を用いるため、それぞれの抵抗性遺伝子 ( $bs^r$ : Kamakura. T. et al., Agric. Biol. Chem., 51, 3165-3168, 1987.  $puro^r$ : Buchholz. F. et al., Nucl. Acids Res., 24, 3118-3119, 1996) を鋳型として、以下の PCR の条件で、反応を行った。

反応組成は鋳型 DNA 10ng、 $10 \times \text{KOD}$  バッファー  $5 \mu\text{l}$ 、 $2 \text{mM dNTP}$   $5 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{M}$  プライマーそれぞれ  $2.5 \mu\text{l}$  (プライマーの塩基配列は以下に示す)、 $25 \text{mM MgCl}_2$   $2 \mu\text{l}$ 、 $2.5 \text{U/ml KOD DNA ポリメラーゼ}$ (TOYOB0 社)  $1 \mu\text{l}$  である。

- 11 -

プライマーは、プラスチシジン抵抗性遺伝子 (bs<sup>r</sup>) については 5'-AAACACATTAAACATTCTCAACAAG-3' (配列番号: 1) および 5'-ACGCGTCGACTTAATTCGGGTATATTGAGTG-3' (配列番号: 2) を、また、ピューロマイシン抵抗性遺伝子 (puro<sup>r</sup>) については 5'-ACCGAGTACAAGCCCACG-3' (配列番号: 3) および 5'-ACGCAGATCTTCAGGCACCGGGCTTG-3' (配列番号: 4) を用いた。温度条件は 94°C 30 秒、94°C 30 秒・54°C 30 秒・72°C 2 分を 25 サイクル、72°C 10 分である。プラスチシジン抵抗性遺伝子 (bs<sup>r</sup>) は SalI で、ピューロマイシン抵抗性遺伝子 (puro<sup>r</sup>) は BglII で制限酵素処理した後、電気泳動し、ゲルからの抽出を行った。抽出には QiaexII (QIAGEN 社) を用いた。

#### [実施例 3] pMX-IRES-EGFP の調製

IRES (internal ribosomal entry site: 内部リボソーム侵入部位) 配列とは、ウイルスの mRNA の 5' 非翻訳領域に存在する配列であり、特徴的な二次構造をとると考えられている。本配列をリボソームが認識して翻訳が開始し、宿主の蛋白翻訳が抑えられ、ウイルス蛋白の翻訳を優位にすることになる。その IRES の後ろに選択マーカー抵抗性遺伝子をつなげるため、pMX-IRES-EGFP (Nosaka, T. et al., EMBO J., 18, 4754-4765, 1999) を NcoI で制限酵素処理した。その後エタノール沈殿を行い、クレノウ反応により平滑末端化した。フェノール/クロロホルム処理のあと、エタノール沈殿を行い、bs<sup>r</sup>を入れる場合には SalI、puro<sup>r</sup>を入れる場合には BglII で制限酵素処理し、それぞれライゲーションした。このようにして IRES の後ろに選択マーカー抵抗性遺伝子が位置することになる。pMX-IRES-bs<sup>r</sup> は NotI (TAKARA 社) と SalI で、pMX-IRES-puro<sup>r</sup> は NotI と BglII で制限酵素処理し、IRES-bs<sup>r</sup>、IRES-puro<sup>r</sup> の断片を切り出した。

#### [実施例 4] gag-pol、エコトロピック env の增幅

gag-pol、エコトロピック env の PCR を以下の条件で行った。

反応組成は錆型 DNA (Shinnick., et.al. Nature, 293, 543, 1981) 10ng、10×LA Taq バッファー 5μl、2mM dNTP 8μl、10μM プライマーそれぞれ 1μl (塩基

配列は以下に示す)、5U/ml LA Taq (TAKARA 社) 0.5μl である。

プライマーは、gag-pol の増幅は 5'-CGAATTGCCGCCACCATGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAA-3' (配列番号 : 5) および 5'-TACGCCGGCGCTCTGAGCATCAGAAGAA-3' (配列番号 : 6)、また、エコトロピック env 増幅は 5'-CGAATTGCCGCCACCATGGCGCGTCAACGCTCTCAAAA-3' (配列番号 : 7) および 5'-TACGCCGGCGCTATGGCTCGTACTCTAT-3' (配列番号 : 8) を用いた。

温度条件は gag-pol の場合、98°C 2 分、98°C 20 秒・68°C 3 分を 20 サイクル、68°C 8 分である。エコトロピック env の場合、98°C 2 分、98°C 20 秒・68°C 2 分を 30 サイクル、68°C 7 分である。

PCR 産物を電気泳動で流したのち、QiaexII (QIAGEN 社) によりゲルから DNA 抽出を行った。これを Original TA cloning kit (Invitrogen 社) により TA ベクターにサブクローニングし、EcoRI、NotI (TAKARA 社) 処理した。

#### [実施例 5] gag-pol、エコトロピック env 発現ベクターの構築

EF1 $\alpha$ のコントロール下で gag-pol-IRES-bs<sup>r</sup>、env-IRES-puro<sup>r</sup>を発現させるために、以下のように pCHO (Hirata, Y. et al., FEBS Letter, 356, 244-248 (1994); Okayama Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 838-45 (1996); pCHO は pEF-BOS (Mizushima. S., and Nagata. S., Nucleic Acids Res., 18, 5332, 1990) に由来する)に挿入した。

#### [pCHO(gag-pol-IRES-bs<sup>r</sup>)]

pCHO を BamHI (TAKARA) により制限酵素処理した後、クレノウ反応により平滑末端化した。そこへ SalI リンカー-d(CGGTCGACCG) (Stratagene 社) (配列番号 : 9) をつけた後、EcoRI、SalI (TAKARA) で制限酵素処理した。ここへ実施例 2, 3 で作製した gag-pol、IRES-bs<sup>r</sup> 断片をいれ、pCHO (gag-pol-IRES-bs<sup>r</sup>) を作製した。

#### [pCHO(ecoenv-IRES-puro)]

pCHO を EcoRI、BamHI (TAKARA 社) で制限酵素処理し、ここへ実施例 2, 3 で

作製したエコトロピック env、IRES-puro<sup>r</sup>を挿入し、pCHO (ecoenv-IRES-puro)を作製した。

[実施例6] アンフォトロピック env 発現ベクターの構築

エコトロピック env は同種由来の細胞にのみ感染可能であるのに対し、アンフォトロピック env は幅広い細胞に感染可能である。このアンフォトロピック env を用いて、実施例4および5と同様に env-IRES-puro<sup>r</sup>の発現ベクターの構築を行った。反応組成はアンフォトロピック env 遺伝子 (4070A) (Ott, D. et.al., J. Virol. 64. 757-766., 1990)の挿入されているプラスミド 10ng、10×KOD バッファー-5μl、2mM dNTP 5μl、10μM プライマー (塩基配列は以下に示す) それぞれ 2.5μl、25mM MgCl<sub>2</sub> 2μl、2.5U/ml KOD DNA ポリメラーゼ(TOYOBO)1μl である。プライマーは、5'-CGAATTCCGCCGCCACCATGGCGCGTTCAACGCTCTCAAAA-3' (配列番号: 10) および 5'-ATGCGGCCGCTCATGGCTCGTACTCTAT-3' (配列番号: 11) を用いた。温度条件は 98°C 3 分、98°C 15 秒・65°C 2 秒・72°C 30 秒を 25 サイクル、72°C 10 分である。

実施例5で作製した pCHO (ecoenv-IRES-puro) を EcoRI、NotI で制限酵素処理し、クレノウ処理によって、平滑末端化した。ここへ上記アンフォトロピック env をライゲーションし、pCHO(amphoenv-IRES-puro)を作製した。

[実施例7] パッケージング細胞の樹立

ヒト中腎由来細胞 293T 細胞(DuBridge, R.B., et. al., Mol. Cell. Biol. 7, 379-387. 1987)に、作製したコンストラクトをトランスフェクションした。トランスフェクションする 16~24 時間前に 293T 細胞を 6cm 細胞/培養皿に 2×10<sup>6</sup> まいた。pCHO(gag-pol-IRES-bs<sup>r</sup>)3μg、Fugene (Boehringer Mannheim 社) 9μl を 200μl のウシ胎児血清を含まない DMEM 培地に混合し、5~10 分静置した。その後、293T 細胞をまいた 6cm dish にゆっくり加えた。48 時間後細胞をはがし、10cm 皿にまき、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地(プラスチシジン 8μg/ml)を加えた。

約 10 日後、pCHO(ecoenv-IRES-puro)、または pCHO(amphoenv-IRES-puro)それ

- 14 -

それを同様にトランスフェクションし、ピューロマイシン(0.8  $\mu$ g/ml およびブラスチシジン(8  $\mu$ g/ml)の両方が入った培地で培養した。細胞が増殖してきたところで限界希釈し、単一のクローンにすることで目的とするパッケージング細胞を樹立した。

ecoenv 発現ベクターが導入された当該パッケージング細胞を「Platinum-E 細胞(PLAT-E 細胞)」と名付けた。該細胞は、「Pt-E」として下記の通り寄託機関に寄託した。

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

(ロ) 寄託日（原寄託日） 平成11年5月31日

(ハ) 寄託番号 生命研条寄第6737号 (FERM BP-6737)

一方、amphoenv 発現ベクターが導入された当該パッケージング細胞を「Platinum-A 細胞(PLAT-A 細胞)」と名付けた。該細胞は、「Plat-A」として下記の通り寄託機関に寄託した。

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

(ロ) 寄託日（原寄託日） 平成11年12月22日

(ハ) 寄託番号 生命研条寄第6977号 (FERM BP-6977)

[実施例8] レトロウイルスの產生

パッケージング細胞により得られたウイルス液の感染効率を調べるために、以下の方法で感染実験を行った。トランスフェクションする16～24時間前に、パッケージング細胞 (ecoenv 導入 PLAT-E 細胞) を 6cm 細胞/培養皿に  $2 \times 10^6$  まいた。M

- 15 -

oLuLV を基本骨格としたレトロウイルスベクターで、GFP が組み込まれているベクター DNA(pMX-GFP : Onishi. M., et al., Exp. Hematol., 24, 324-329, 1996)3  $\mu$ g、Fugene 9  $\mu$ l を 200  $\mu$ l の血清を含まない DMEM 培地に混合し、5~10 分おいた。その後、これをパッケージング細胞をまいた 6cm 皿にゆっくり加えた。

48 時間後に上清（ウイルス液）を回収し、3000rpm で 5 分間遠心した。このうち、500  $\mu$ l に 1mg/ml ポリブレン(sigma 社)を 5  $\mu$ l、 $\times 1000$  IL3(R and D)を 1  $\mu$ l 加え、 $1 \times 10^5$  の BaF/3 細胞に 5 時間感染させた。5 時間後、RPMI1640 培地(IL3 含有)を 500  $\mu$ l 加えた。感染した細胞内において GFP が発現され、395nm 波長の光で励起し、509nm の波長の光を放出することを利用し、FACScan (fluorescein activated cell sorter : Becton-Dickinson) を用いて発光する（感染発現している）細胞の割合を感染効率として、24 時間後に測定した。BaF/3 細胞に対する感染効率はウイルス液を濃縮することなく用いても 95%に達した。

液体窒素から同時期に起こした PLAT-E (ecoenv 導入 PLAT-E 細胞) と BOSC23 より得られたウイルス液の感染効率を BaF/3 細胞を用いて測定したところ、継代を開始して 7 日目では、いずれのパッケージング細胞を用いた場合でも 90%以上の感染効率が確認されたが、継代 2 ヶ月後には、BOSC23 を用いた場合の感染効率が 23%にまで低下したのに対し、PLAT-E を用いた場合では、7 日目の感染効率と同程度の感染効率が、継代 2 ヶ月後および 4 ヶ月後においても保持されていることが確認された（継代を開始してから 4 ヶ月後において、Ba/F3 細胞に対し 70%以上の感染効率が保持されていた）。すなわち、約 4 ヶ月の間、約  $1 \times 10^7/ml$  の力価のレトロウイルスを產生することができた。

Plat-A 細胞より得られたウイルス液の感染効率を BaF/3 細胞を用いて測定したところ、継代開始して 7 日目に 30% の感染効率が確認された（およそ  $1 \times 10^6/ml$  の力価）。

#### [実施例 9] Plat-E の安全性の検討

パッケージング細胞にレトロウイルスベクターを導入した際、組み換えにより複

製能を有するレトロウイルス (RCR ; replication competent retroviruses) が出現していないかを検討した。

NIH3T3 細胞  $5 \times 10^4$  を 6cm 細胞/培養皿にまいた 16 時間後、pMX-neo をパッケージング細胞に導入して產生されたウイルス液 1ml に 1mg/ml のポリブレン 10 $\mu$ l を加え、ウイルスを感染させた。4 時間後、10%FCS DMEM 3ml を加え、コンフルエントになるまで培養した。1 回継代後、終濃度 2 $\mu$ g/ml ポリブレンの添加された DMEM で 50%コンフルエントになるまで培養した後、培地を交換し、2ml の DMEM で 2~3 日培養した。この上清を 0.45 $\mu$ m フィルターに通し、新たに NIH3T3 細胞に感染させ、G418 (neo) の入った DMEM で選択培養した。もし複製能を有するレトロウイルスが產生されているならば、G418 耐性コロニーが出現するはずである。しかしながら、このようなコロニーは検出されなかった。

#### [実施例 10] Bosc23 細胞及び Phoenix-E 細胞と比較した Plat-E 細胞の安定性の検討

本発明者等は、Plat-E 細胞がその初期経過において、一過性のトランスフェクションにより長期間安定して高い力価のレトロウイルスを產生することができるか否かにつき、Bosc23 細胞及び Phoenix-E 細胞の場合と比較した。この 3 つのパッケージング細胞系列の培養条件を以下に示す。Bosc23 細胞は製造業者の指示に従い、GPT 選抜試薬を含む、10%牛胎児血清を添加した DMEM にて増殖させた (Specialty Media, Lavayette, NJ, USA)。Phoenix-E 細胞は、CD8 の発現を指標に FACS により分類し、ハイグロマイシン (300 $\mu$ g/ml) 及びジフテリア毒素 (1 $\mu$ g/ml) を含む、10%牛胎児血清を添加した DMEM 中で 1 週間培養した後、ハイグロマイシン及びジフテリア毒素を含まない、10%牛胎児血清を添加した DMEM 中に移植した。Plat-E 細胞は、常に、プラスチジン (10 $\mu$ g/ml) 及びプロマイシン (1 $\mu$ g/ml) を含む、10%牛胎児血清を添加した DMEM 中にて維持した。Bosc23 から產生されたレトロウイルスの感染効率は 3 ヶ月以内に減少し、Phoenix-E 細胞から產

生されたレトロウィルスの感染効率も同時に減少した。一方、Plat-E は薬剤選抜圧がかけられた状況下において少なくとも 4 ヶ月間、一過性の遺伝子導入で、NIH3T3 細胞に対して平均約  $1 \times 10^7/\text{ml}$  の力値をもち、BaF/3 細胞に対して 75% 以上（最高 99%）の感染効率を持つレトロウィルスを產生した。

Plat-E、Bosc23、及び Phoenix-E パッケージング細胞系列における Gag-pol および env mRNA の発現レベルを比較するために、3 週間培養した細胞を用いてノーザンプロット解析を行なった。Plat-E 細胞における Gag-pol および env mRNA の発現レベルは、他の細胞系と比較して、それぞれ 4 倍と 10 倍であった。

細胞溶解物における RT 活性の解析も行なった。Plat-E 細胞では、Bosc23 及び Phoenix-E 細胞と比較して、少なくとも 2 倍の RT 活性が検出された。さらに、env 蛋白質の発現レベルは、env 遺伝子産物に対する抗体染色によって評価した場合、Bosc23 及び Phoenix-E 細胞よりもかなり高かった。

以上から、Plat-E 細胞が高力値のレトロウィルスを長期間安定的に生産することができる事が示された。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、長期間継代しても高力値の感染性ウイルスを產生する能力を保持するウイルス產生細胞が提供された。また、該ウイルス產生細胞を用いる、高力値の感染性ウイルスの產生方法が提供された。本発明のレトロウィルスパッケージング細胞を用いれば、高力値のレトロウィルスを安定に供給することが可能となる。また、パッケージング細胞に含まれるウイルスゲノムを最小限にすることにより、複製能を有するレトロウィルス (RCR) 等の望ましくない組換え体ウイルスの生成の可能性をより低くすることに成功した。従って、本発明のレトロウイルスパッケージング細胞は、生物学、医学研究分野において、レトロウイルスベクター作製のための強力なツールとなる他、遺伝子治療における遺伝子導入ベ

クターの作製にも有用である。

## 請求の範囲

1. レトロウイルスの産生に用いられる細胞であって、 $EF1\alpha$ プロモーターの下流にレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが機能的に結合した発現構築物を有する細胞。
2. レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、*gag*、*pol*、*env*からなる群より選択される1または複数のタンパク質をコードするDNAである、請求項1に記載の細胞。
3. *gag*、*pol*、*env*のすべてを発現する、請求項2に記載の細胞。
4. *gag*および*pol*を発現する発現構築物と*env*を発現する発現構築物とを有する、請求項3に記載の細胞。
5. *env*がエコトロピックレトロウイルス由来の*env*またはアンフォトロピックレトロウイルス由来の*env*である、請求項3または4に記載の細胞。
6. 発現構築物中のレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAの翻訳開始コドンの上流に、*Kozak*のコンセンサス配列が配置されている、請求項1から5のいずれかに記載の細胞。
7. レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAがIRES配列を介して選択マーカーをコードするDNAと結合している、請求項1から6のいずれかに記載の細胞。
8. レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、該タンパク質のコード領域以外のウイルスゲノム由来DNAを実質的に有さない、請求項1から7のいずれかに記載の細胞。
9. 細胞が293細胞由来である、請求項1から8のいずれかに記載の細胞。
10. 細胞が293T細胞由来である、請求項9に記載の細胞。
11. 寄託番号FERM BP-6737または寄託番号FERM BP-6977で特定される細胞。

12. 請求項1から11のいずれかに記載の細胞に、少なくとも1つの構造タンパク質をコードする遺伝子を欠損しているレトロウイルスベクターDNAを導入する工程を含む、レトロウイルスの產生方法。
13. レトロウイルスベクターDNAが、gag、pol、およびenvをコードする遺伝子をすべて欠損している、請求項12に記載の方法。
14. レトロウイルスベクターDNAに外来遺伝子が含まれている、請求項12または13に記載の方法。
15. 請求項12から14のいずれかに記載の方法により生産されたレトロウイルス。

## SEQUENCE LISTING

<110> KITAMURA, Toshio

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Packaging cell

<130> C1-105DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-154364

<151> 1999-06-01

<150> JP 2000-17831

<151> 2000-01-21

<160> 11

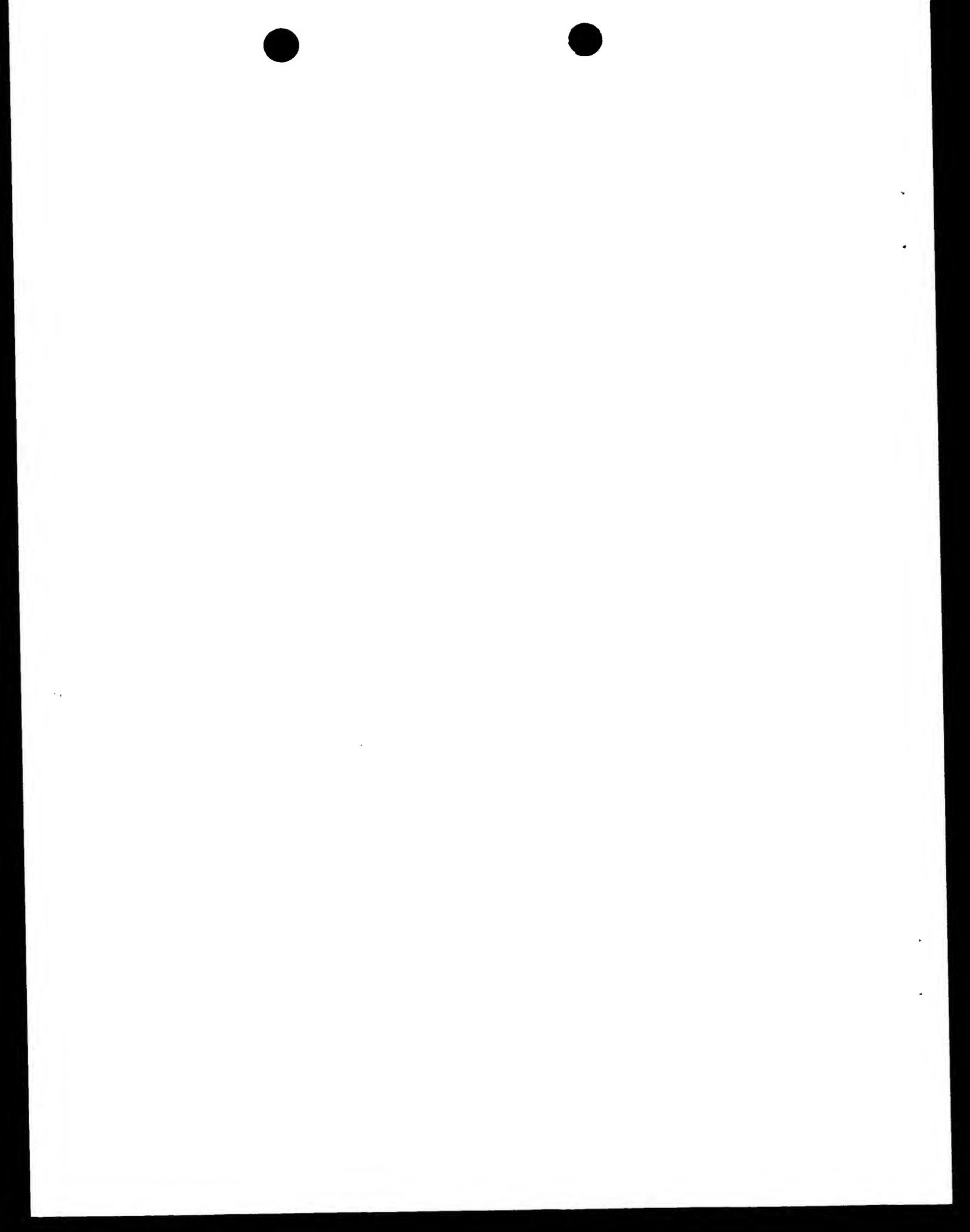
<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

aaaacattta acatttctca acaag 25

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

acgcgtcgac ttaattcgg gtatatttga gtg 33

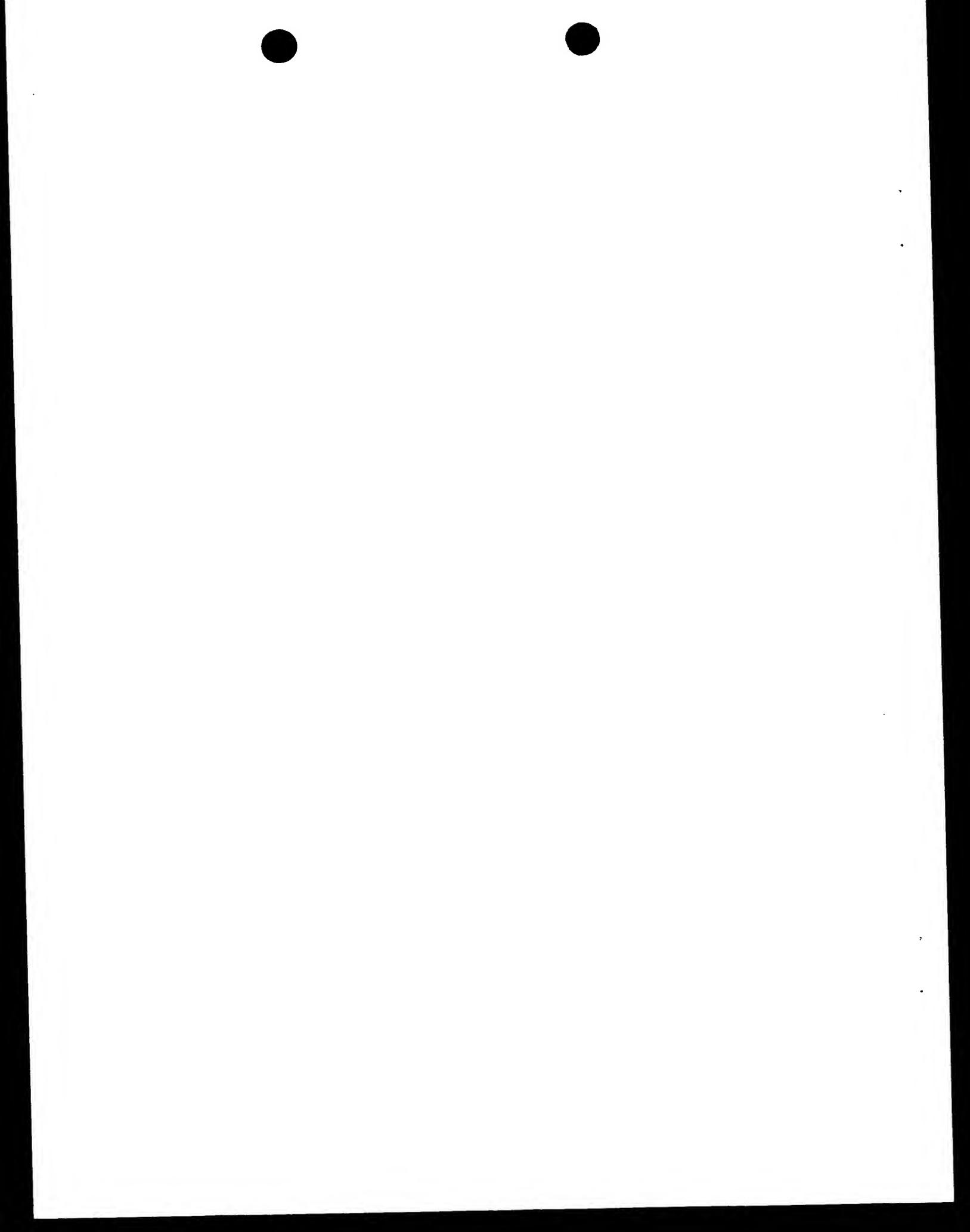
<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

accgagtaca agcccacg 18

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

acgcagatct tcaggcacccg ggcttg 26

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence



<400> 5

cgaattcgcc gccaccatgg gccagactgt taccactccc ttaa 44

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tacgccggcg ctctgagcat cagaagaa 28

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7



cgaattcgcc gccaccatgg cgcggttcaac gctctcaaaa 40

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

tacgccggcg ctatggctcg tactctat 28

<210> 9

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized "SalI linker" Sequence

<400> 9

cggtcgaccg 10



<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

cgaattcgcc gccaccatgg cgcggttcaac gctctcaaaa 40

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

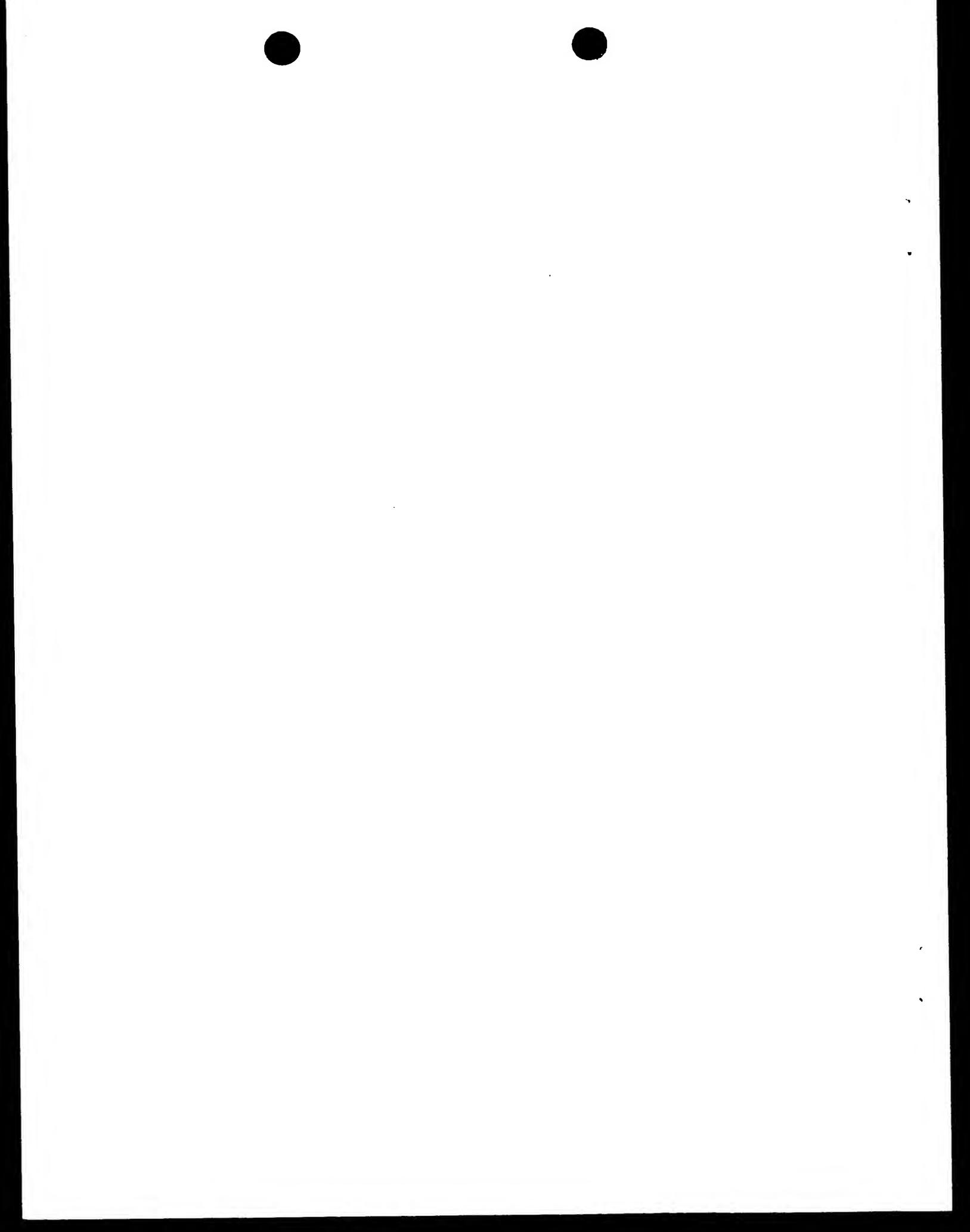
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

atgcggccgc tcatggctcg tactctat 28



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03557

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 5/10, C12N 15/48, C12N 15/867, C12N 7/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 5/10, C12N 15/48, C12N 15/867, C12N 7/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUISIT, G. et al., "Functional characterization of adenovirus/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer cell lines", <i>Hum. Gene Ther.</i> (1999.Jan.) Vol.10, No.2, p.189-200	1-15
P, X	WO, 99/64568, A1 (UNIV NANTES), 16 December, 1999 (16.12.99) & FR, 2779445, A1	1-15
X Y	Toshio KITAMURA et al., "Retrovirus ni yoru Idenshi Donyuhou to sono Ouyou", <i>Jikken Igaku Bessatsu, Shin Idenshi Kougaku Handbook</i> (1998) p.245-249	15 1-15
X Y	KITAMURA, T. et al., "New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening", <i>Int. J. Hematol.</i> (1998) Vol.67, No.4, p.351-359	15 1-15
A	YOGALINGAM, G. et al., "Regulation of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase expression in retrovirus-transduced feline mucopolysaccharidosis type VI muscle cells", <i>DNA Cell Biol.</i> (Mar. 1999) Vol.18, No.3,	1-15

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
01 September, 2000 (01.09.00)Date of mailing of the international search report  
12 September, 2000 (12.09.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03557

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	p.187-195  MORITA, S. et al., "Plat-E: An efficient and stable system for transient packaging of retroviruses", Gene Ther. (Jun. 2000) Vol.7, No.12, p.1063-1066	1-15

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 5/10, C12N 15/48, C12N 15/867, C12N 7/01

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 5/10, C12N 15/48, C12N 15/867, C12N 7/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST ファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	DUISIT, G. et al. "Functional characterization of adenovirus/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer cell lines", Hum. Gene Ther. (1999. Jan.) Vol. 10, No. 2, p. 189-200	1-15
P, X	WO, 99/64568, A1 (UNIV NANTES) 16. 12月. 1999 (16. 12. 99) & FR, 2779445, A1	1-15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 09. 00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X Y	北村俊雄他「レトロウイルスによる遺伝子導入法とその応用」 実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック(1998)p. 245-249	15 1-15
X Y	KITAMURA, T. et al. "New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening", Int. J. Hematol. (1998) Vol. 67, No. 4, p. 351-359	15 1-15
A	YOGALINGAM, G. et al. "Regulation of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase expression in retrovirus-transduced feline mucopolysaccharidosis type VI muscle cells", DNA Cell Biol. (1999. Mar.) Vol. 18, No. 3, p. 187-195	1-15
T	MORITA, S. et al. "Plat-E:An efficient and stable system for transient packaging of retroviruses", Gene Ther. (2000. Jun.) Vol. 7, No. 12, p. 1063-1066	1-15